



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2001004621 A**(43) Date of publication of application: **12.01.01**

(51) Int. Cl.

G01N 33/48
G01N 33/53
G01N 33/536
G01N 33/569
G01N 33/576

(21) Application number: **11178174**(71) Applicant: **INTERNATL REAGENTS CORP**(22) Date of filing: **24.06.99**(72) Inventor: **YANAGIHARA OSAMU**(54) **VIRION INTERNAL PROTEIN DISCHARGING MEANS**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To break an envelope of a virus so as to allow discharge of core protein by treating a specimen containing a virus having an envelope with alkali under the existence of a protein modifying agent and a non-ionic surfactant.

SOLUTION: To a specimen such as serum, a solution containing a protein modifying agent and a non-ionic surfactant and an alkaline solution are added directly without performing concentration deproteinization and the like, and inactivation of an antibody and breakage

of an envelope are carried out at the same time. After the lapse of a fixed time, an acid solution is added to return the specimen treating solution to neutral and a sample for a detection system is prepared. As an objective specimen, humor such as whole blood, plasma, serum, urine, cerebrospinal fluid, sperm, saliva, maternal milk, or mucus, feces, lesioned tissue, pus, sputum and a virus cultivation system sample is used. In this treating means, a protein modifying agent is added to a specimen, a non-ionic surfactant is added, and then, the specimen is treated with an alkaline solution. These three kinds of treatment are carried out on the specimen simultaneously.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-4621

(P2001-4621A)

(43) 公開日 平成13年1月12日 (2001.1.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
G 0 1 N	33/48	G 0 1 N 33/48	A 2 G 0 4 5
	33/53	33/53	D
	33/536	33/536	C
	33/569	33/569	
	33/576	33/576	Z
審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 6 頁)			
(21) 出願番号	特願平11-178174	(71) 出願人	000170565 国際試薬株式会社 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号
(22) 出願日	平成11年6月24日 (1999.6.24)	(72) 発明者	柳原 収 兵庫県神戸市西区室谷一丁目1-2 国際 試薬株式会社研究開発センター内
		(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
		F ターム (参考)	2G045 AA25 AA28 BA13 BB07 BB29 BB41 BB51 CA26 CB21 DA36 FB03

(54) 【発明の名称】 ウィルス粒子内部蛋白質の放出処理手段

(57) 【要約】

【目的】 簡便でかつ検出系で確実に捕捉しうるウィルス粒子内部蛋白、とりわけH C Vコア蛋白を放出させるための前処理手段を提供すること。

【構成】 本発明は、エンベロープを有するウィルスを含む検体を、カオトロピックイオン等の蛋白変性剤、及び非イオン性の界面活性剤の存在下で、アルカリ処理する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 エンベロープを有するウイルスを含む検体を、蛋白変性剤及び非イオン性界面活性剤の存在下で、アルカリ処理を行った後に中和することを特徴とする、ウイルス内部蛋白質放出処理手段。

【請求項 2】 放出処理を行なうウイルス内部蛋白質が、C型肝炎ウイルス（HCV）のコア蛋白質である請求項 1 のウイルス内部蛋白質放出処理手段。

【請求項 3】 請求項 1 または請求項 2 の手段を用いる、抗体の検査による予備スクリーニングを行うことなく直接検体に対してウイルス内部蛋白質を測定することからなるウイルス感染症の早期診断方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】 本発明はウイルス感染症の診断、経過観察、治療方針決定、治療効果判定を目的とするウイルスの同定及び定量に関するものであり、特にエンベロープを有するウイルスの内部蛋白質の検出あるいは定量手段、及び該ウイルスを含有する検体におけるウイルス内部蛋白質放出手段に関する。

【0002】

【従来の技術】 ウイルス感染症の診断、経過観察、治療方針決定、治療効果判定において近年、遺伝子学的検査によるウイルスの同定及び定量が盛んに行なわれるようになったが、操作的に煩雑で難易度が高い、検査に要する時間が長い、検査コストが高い、検査結果の再現性が必ずしも良くない等の問題点が指摘されている。

【0003】 また、従来公知のウイルスの同定及び定量方法である、ウイルス表面蛋白質をウイルス抗原として測定する方法は、いくつかのウイルスに対して臨床検査ならびに献血スクリーニングに利用されている。しかし多くのウイルス感染の場合、宿主の免疫応答により産生されたウイルス表面抗原に対する抗体により、測定が妨害されたり、宿主の免疫から逃れるためのウイルス側の表面抗原の変異により、表面抗原の測定はウイルスの検出及び定量には適していないケースが多い。

【0004】 臨床検査の分野でウイルスの内部蛋白質を測定するものとしては、HBV の DNA ポリメラーゼの活性を測定する検査があるが、特殊な検査で煩雑かつ特別な装置が必要であり、一般普及はしていない。

【0005】 上記のウイルスの同定及び定量方法に代わる方法として、近年、HCV のコア蛋白質を検体前処理を行った後に EIA 法で測定するキットが開発され、1998 年より健康保険も適用となり一般の臨床検査に利用されるようになったが、検体前処理操作が煩雑であるため、さらに簡易な前処理方法が望まれている。

【0006】 C型肝炎ウイルス（HCV）は、直径約 60 nm の RNA ウイルスで、エンベロープをもつ。HCV RNA は一本鎖プラス鎖で、約 9500 塩基配列よりなっている。遺伝子構造はフラビウイルスに類似して

おり、5' 末端と 3' 末端に非翻訳領域（UTR）があり、この間に約 3000 アミノ酸をコードする翻訳領域が存在する。翻訳領域は、5' 側より、構造蛋白質をコードするコア領域、エンベロープ領域 1、エンベロープ領域 2 があり、これに続いて非構造領域が存在する。

【0007】 C型肝炎の診断は、通常まず血中 HCV 抗体の測定が行われる。この測定には、例えば非構造領域とコア領域の発現蛋白質が抗原として用いられる。この測定系に関してはすでに多くのキットが市販され、急性及び慢性肝炎の診断・治療の手段として汎用されている。しかしこの測定は、あくまで血中 HCV 抗体の有無を知るもので、血中の HCV そのものを測定するものではない。

【0008】 HCV のコア蛋白質を測定する手段は、血中のウイルス量を測定するために開発された系であり、すでにキットが市販され臨床検査に利用されている。このキットは、検体中の HCV より HCV コア蛋白質を放出させる検体前処理ステップと、この検体前処理液中の HCV コア蛋白質を、これに対するモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法（EIA）で測定するステップよりなる。

【0009】 この検体前処理方法は、まず血清検体にポリエチレングリコール溶液を加え冷蔵放置により HCV を不溶化させた後、遠心処理を行い沈殿画分として回収し、上清を除去して HCV 粒子の濃縮ならびに他の血清成分（反応妨害成分）の除去・低減を行う。次に沈殿画分を再溶解し、アルカリを加えて一定時間放置する。この時、後の EIA 反応時に競合阻害的に働く検体中の HCV 抗体（コア抗体）が、失活する。次いで非イオン性界面活性剤を含む酸性溶液を加えて、検体処理液を中和するとともに、HCV 粒子のエンベロープを剥離させコア蛋白質を露出させる。以上の処理過程が検体前処理ステップであるが、沈殿画分の再溶解時に尿素溶液を用いると、HCV 粒子からのコア蛋白質放出に効果的であり、尿素の添加も含めた上述の検体前処理方法が、現在臨床検査で利用されている公知の技術である（特開平 8-29427）（医学と薬学、36, (1), 1996）。

【0010】 エンベロープをもつウイルスの内部抗原を測定する手段として別の方法は、蛋白質分解酵素処理、熱処理などの処理で、検体中に存在する抗体を不活化したのち、エンベロープ部分を破壊するために非イオン性界面活性剤を使うことが提案されている（特開平 8-50133）。

【0011】 より新しい提案としては、HCV を含む検体を、カオトロピックイオン、酸性化剤、および非イオン性界面活性剤を含む処理液で処理して、検体中に存在する抗体の不活化とエンベロープの破壊を同時に可能とする方法が提案されている（特開平 11-51940）。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、上記のような先行文献を考慮に入れ、従前より簡便でかつ検出系で確実に捕捉しうるウィルス粒子内部蛋白、とりわけHCVコア蛋白を放出させるための前処理手段を提供することにある。詳しくは、従前確立された方法を踏襲しながらも、その工程をより簡略化し、前処理の経済性を上げ、同時に従前の測定の特異性を維持して、HCVコア蛋白を測定するための前処理手段を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明は、エンベロープを有するウィルスを含む検体を、蛋白変性剤及び非イオン性界面活性剤の存在下でアルカリ処理することにより、ウィルスのエンベロープが破壊され、コア蛋白質が放出されることを見だし、本発明を完成した。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明は、血清等の検体に対して濃縮・除蛋白等の処理を施すことなく、蛋白変性剤及び非イオン性界面活性剤を含む溶液とアルカリ溶液を直接添加し、抗体の不活化とエンベロープの破壊を同時に、一定時間後に酸性溶液を添加して検体処理液を中性に戻し、検出系のサンプルとする。

【0015】なお本発明の対象となる検体は、全血、血漿、血清、尿、髄液、精液、唾液、母乳、粘液等の体液や糞便、病変部組織、膿、喀痰、およびウィルス培養系試料などである。

【0016】また、対象となるウィルスは、ヘルペスウィルス(HSV、CMV、ZVZ、EBV、HHV6など)、インフルエンザウィルス、ヒト免疫不全ウィルス(HIV)、ヒト成人T細胞白血病ウィルス(HTLV)、肝炎ウィルス(HBV、HCV、HDV、HGV)、その他かぜ症候群、消化器系疾患、中枢神経系疾患、呼吸器系疾患、出血熱等の様々な疾患の病因ウィルスである。

【0017】本発明の処理手段は、従前の煩雑な操作や特別な装置も不要であり、所要時間も大幅に短縮される。また検出系に必要なサンプル量を得るために、従前の方法では200 μ Lの検体が必要であったが、本発明では40 μ Lで測定可能となる。

【0018】本発明の処理手段は、検体に対して蛋白変性剤を添加する。蛋白変性剤としては、尿素および塩酸グアニジンが一般的に良く知られているが、チオシアン酸ナトリウム、過塩素酸ナトリウムなどのカオトロブ剤もコア蛋白放出に効果がある。検体処理時の蛋白変性剤濃度としては0.5M以上が好ましいが、より好適には1~5Mである。

【0019】本発明の処理手段は、検体に対して非イオン性界面活性剤を添加する。非イオン性の界面活性剤としてはポリオキシエチレン誘導体が一般的であり、トリトンX-100、ノニデットP40、ツイーン20、ツ

ィーン80、ブリッジ35などが例示される。より好適にはツイーン80で、処理時の濃度は1~10%であり、より好適には2~4%である。

【0020】本発明の処理手段は、検体に対して、アルカリ溶液による処理を行う。アルカリとしては一般的には水酸化ナトリウムや水酸化カリウムが用いられ、処理時のアルカリ度は0.05~0.5Nで、より好適には0.1~0.4Nである。

【0021】本発明の処理手段は、検体に対して、以上の3つの処理を同時に行う。処理温度および時間は10~30℃で約5~30分であり、好適には20℃付近で10~20分である。処理温度が低すぎたり反応時間が短いと、抗体の不活化、エンベロープの破壊、コア蛋白の放出が充分でなく、逆に処理温度が高く処理時間条件が長くなると、コア蛋白の変性が過度となり、測定値の低下を招く。

【0022】抗体の不活化およびエンベロープの破壊後、検体処理液に適当な酸性溶液を加えることでアルカリを中和する。中和後のpHとしては約6~約8、より好適には約7近辺である。この中和処理により検体前処理は終了し、以降の検出系にかけられる。この前処理により、検体前処理液は元の検体より希釈されることになる。後の検出系への血清成分の妨害等を考慮した場合、元の検体より数倍希釈されるのが望ましいが、検出限界を考慮して約2~4倍が最適である。

【0023】かくして、提供される前処理手段を施された検体は、希釈処理により最低検出限界が従前の8pg/mLから20~40pg/mLとなるので、以降の検出系は従前の検出系より2.5~5倍検出感度が高いものを用いることが望ましい。検出系の感度を上げる手段としては、高感度発光基質の採用やより高親和性の抗体を用いることで、達成可能と考えられる。(臨床化学, 23, 259~267, 1994)

【0024】以下に本発明の実施例として、HCVを例示して具体的に説明する。しかし本発明は、エンベロープを有するを対象とする限りはこの実施例に限定されるものではない。

【0025】実施例1

HCV抗体およびHCV-RNA陰性パネル血清1例と、HCV-RNA陽性パネル血清2例を検体として、検体前処理を行った。検体各40 μ Lに対して、尿素6M、ツイーン80 6%溶液60 μ Lを加え、ついで2.4N水酸化ナトリウム溶液20 μ Lを添加し、撹拌した。この検体前処理液を、10℃、20℃、30℃、40℃の四温度条件下で、1分間、5分間、10分間、20分間、30分間、60分間の六時間条件で処理後、0.4Mクエン酸溶液を40 μ L添加撹拌し、検体前処理液160 μ Lを得た。この検体前処理液を試料として、従前の検出系を用いてHCVコア蛋白の測定を行った(医学と薬学, 36, (1), 1996)。その結果

を、表1及び図1に示した。

【0026】両陽性パネルとも最大値が得られるためには、ある程度の処理時間が必要で、処理温度が低い程その所要時間は長くなるが、処理温度を高くすると至適処理時間以降の測定値の低下がより急激となる。処理温度20℃で10～20分間の処理が、最大値を得られかつ時間変化に対する測定値の変化の小さい好ましい条件であると判断される。これは水酸化ナトリウム濃度0.4Nでの処理時の至適条件であるが、水酸化ナトリウム濃度が低い場合には至適条件は、より高い温度やより長い時間に移行し、水酸化ナトリウム濃度が高い場合には至適条件は、より低い温度やより短い時間に移行する。

【0027】

【表1】

HCVコア蛋白測定結果(pg/mL)

		処理温度			
陰性パネル		10℃	20℃	30℃	40℃
処理時間(分)	1	7	0	12	22
	5	3	0	7	4
	10	1	6	16	0
	20	0	0	9	6
	30	5	2	14	9
	60	5	1	17	0
陽性パネル-1		10℃	20℃	30℃	40℃
処理時間(分)	1	58	147	196	196
	5	167	233	284	294
	10	213	288	312	210
	20	324	305	194	50
	30	303	219	123	28
	60	278	110	42	15
陽性パネル-2		10℃	20℃	30℃	40℃
処理時間(分)	1	364	545	615	516
	5	653	750	816	835
	10	1139	847	889	697
	20	911	774	613	126
	30	938	715	369	44
	60	793	368	74	22

40pg/mL未満は検出限界未満

【0028】実施例2

HCV抗体およびHCV-RNA陰性血清1例と、HCV-RNA陽性パネル血清2例を検体として、それぞれ10回ずつ以下の操作により検体前処理を行った。検体各40μLに対して、尿素6M、ツイーン806%溶液60μLを加え、ついで2.4N水酸化ナトリウム溶液20μLを添加し、撹拌した。室温で10分間処理後、0.4Mクエン酸溶液を40μL添加撹拌し、検体前処理液160μLを得た。この検体前処理液を試料として、従前の検出系を用いてHCVコア蛋白測定を行った(医学と薬学, 36, (1), 1996)。その結果を、表2に示した。

【0029】陰性パネルは全て検出限界(40pg/mL)未満であり、陽性パネルの測定値のCVは4%前後であった。前処理操作を含むEIA測定の結果として

は、満足できる結果であった。

【0030】

【表2】

同時再現性

	HCVコア蛋白測定値(pg/mL)		
	陰性Panel	陽性Panel-1	陽性Panel-2
1	0.0	273	876
2	1.2	297	873
3	0.0	285	860
4	0.0	304	938
5	0.0	283	947
6	0.0	286	922
7	0.0	294	842
8	0.0	285	887
9	0.0	277	913
10	0.0	294	905
Mean		286	896
SD		11.9	34.5
CV(%)		4.2	3.8

20 【0031】実施例3

健康人血清およびHCV-RNA陽性患者血清各30例について、その40μLに対して尿素6M、ツイーン806%溶液60μLを加え、ついで2.4N水酸化ナトリウム溶液20μLを添加し、撹拌した。室温で10分間処理後、0.4Mクエン酸溶液を40μL添加撹拌し、検体前処理液160μLを得た。この検体前処理液を試料として、従前の検出系を用いてHCVコア蛋白の測定を行った。HCV-RNA陽性患者血清30例については、従前の検体前処理法(PEG法)でも前処理を行い、同じHCVコア蛋白の測定を行った(医学と薬学, 36, (1), 1996)。その結果を、表3、表4に示した。

30

【0032】健康人30例の血清は全て検出限界(40pg/mL)未満であり、特異性上の問題は認められなかった。HCV-RNA陽性患者30例の血清については、本発明の前処理法での測定値と従前の処理法(PEG法)での測定値の比をとると、1.0～3.1(平均値1.8)であった。従前の方法より高値に出ることに關しては、従前の前処理法ではPEG処理による沈殿画分にHCVが100%回収されておらず、回収率が検体毎に血清の状態により異なるためと推測された。従って本発明の前処理法は従前の前処理法に比べて、よりウイルス量を反映した結果が得られる可能性が示唆される。

40

【0033】

【表3】

健康者血清30例測定結果

	本法測定結果	
	ΔRFI	pg/mL
1	0.4	検出限界未満
2	0.4	検出限界未満
3	0.1	検出限界未満
4	0.3	検出限界未満
5	0.3	検出限界未満
6	0.3	検出限界未満
7	0.2	検出限界未満
8	0.4	検出限界未満
9	0.3	検出限界未満
10	0.5	検出限界未満
11	0.3	検出限界未満
12	0.2	検出限界未満
13	0.5	検出限界未満
14	0.3	検出限界未満
15	0.4	検出限界未満
16	0.3	検出限界未満
17	0.1	検出限界未満
18	0.5	検出限界未満
19	0.2	検出限界未満
20	0.4	検出限界未満
21	0.4	検出限界未満
22	0.3	検出限界未満
23	0.6	検出限界未満
24	0.5	検出限界未満
25	0.5	検出限界未満
26	0.2	検出限界未満
27	0.4	検出限界未満
28	0.3	検出限界未満
29	0.6	検出限界未満
30	0.5	検出限界未満

【0034】

【表4】

HCV-RNA陽性血清30例測定結果

	本法測定結果		PEG法測定結果	
	ΔRFI	pg/mL	ΔRFI	pg/mL
1	6.4	201	22.7	139
2	5.4	170	20.3	123
3	8.3	263	28.7	174
4	20.7	650	73.8	448
5	13.5	426	22.8	138
6	9.3	294	36	218
7	25.1	789	70.7	429
8	38.8	1219	110.8	673
9	48.6	1524	82.1	499
10	32.6	1022	82	498
11	12.4	391	29.8	181
12	35.1	1102	60.3	366
13	10.2	320	28.7	174
14	14.7	463	40.9	248
15	80.2	2518	226.8	1377
16	85.0	2667	286	1737
17	1.8	57	9	55
18	11.2	352	42.6	258
19	39.3	1233	120.8	734
20	21.9	689	59.3	360
21	9.1	288	33.6	204
22	21.3	670	83.4	507
23	20.9	658	67.2	408
24	26.0	819	96.9	589
25	27.4	861	128.3	780
26	17.4	548	35.2	214
27	15.9	501	38	203
28	18.4	578	52.8	321
29	13.1	411	39.9	242
30	8.5	267	36.9	224

10

20

30 【0035】

【発明の効果】以上説明したように本発明の検体前処理手段は、従前の方法に比較して、行程の簡略化、短時間処理を可能とするものであり、従来約3時間をかけてなされていた処理を、20分程度で達成可能とするものであり、HCV等のエンベロープを有するウィルスを対象とするコア蛋白の検査業務の効率化を極めて増進させるものである。

【図面の簡単な説明】

40 【図1】HCV-RNA陽性パネル血清2例のHCVコア蛋白測定値に対する、検体処理時間及び検体処理温度の影響を示す図である。

【図1】

